Adansonia, sér. 2, 13 (3) : 313-332, 1973.

LA PAROI MÉGASPORALE DE L'*ISOETES SETACEA* Bosc ex Delile

ÉTUDE EN MICROSCOPIES PHOTONIQUE ET ÉLECTRONIQUES LOCALISATION ET NATURE DE LA SILICE ENTRANT DANS SA CONSTITUTION

par Daniel Robert, Françoise Roland-Heydacker, Janine Denizot, Jean Laroche, Pierre Fougeroux et Léon Davignon

Résumé : Les techniques de microscopies photonique et electroniques par transmission et à balayage, de microanalyse par sonde électronique, d'absorption aux infrarouges ont permis de préciser l'organisation et la nature chimique des enveloppes de la mégaspore de l'*Isoetes setacea* Bosc ex Delile. La paroi possède trois couches : une périspore externe, très épaisse, à ornementations spécifiques, constituée par un gel de silice pure; une exospore complexe, caractérisée dans sa partie périphérique par une structure alvéolaire et la présence de granules siliceux; enfin, une endospore cellulosique, fine et homogène.

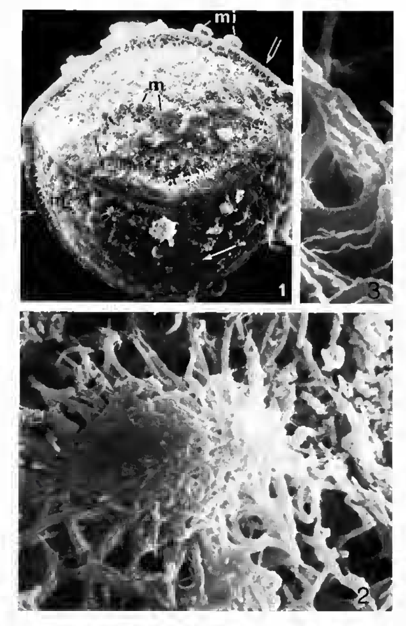
Summary: The techniques of photonic and electronic microscopies (transmission and scanning), those of microprobe analysis and those of infrared absorption have enabled us to determine the organization and the chemical nature of the walls of the megaspore of *Isoetes setacea* Bosc ex Delile. The wall consists of three layers: a very thick external perispore made of pure amorphous silica with specific ornementations; a complex exospore which is characterized in its peripheric part by an alveolar structure and the presence of silica granules; at last, a thin and homogeneous cellulosic endospore.

INTRODUCTION

L'essentiel des connaissances sur les parois mégasporales des *Isoetes* est dû, entre autres, aux travaux de Tschistiakoff (1873), Fitting (1900), La Motte (1933), Erdtman (1957, 1971), Pettitt (1966, 1971).

Anciens et trop souvent fragmentaires, ces résultats ont parfois donné naissance à des interprétations divergentes pour ce qui concerne, en particulier, l'organisation des parois sporales et la nature chimique de la périspore.

Aussi, avons-nous été conduits, avec des moyens modernes d'investigation, à entreprendre de nouvelles recherches sur ces différents points.



Pl. 1. — Microscopie électronique à balayage : 1, Vue proximale d'une mégaspore. Entre les bourrelets trilètes (flèches simples) et le bourrelet subéquatorial (flèches doubles), la surface est ornée de mamelons, *m*; *mi*, microspores (× 160). — 2, Surface de la périspore; détail d'un malemon hérissé de spicules (× 2 200). — 3, Spicules de la périspore. Noter leur aspect torsadé (× 5 250).

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Les mégaspores étudiées proviennent de pieds d'*Isoetes setacea* Bosc ex Delile (= *Isoetes delilei* Rothm.) récoltés en septembre 1972 dans les mares du domaine de Roquehaute (Hérault).

Les mégaspores furent prélevées à l'intérieur de sporanges soit fermés, soit partiellement décomposés; la décomposition des sporanges conditionne, dans la nature, la sporulation. Elles furent ensuite fixées par le glutaraldéhyde, postosmiées, incluses dans l'épon, puis débitées en coupes :

— semi-fines pour, après coloration par le bleu de toluidine ou la réaction APS, les observations en microscopie photonique;

— ultra-fines pour, après avoir été contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb, les examens en microscopie électronique par transmission.

Pour les études en microscopie électronique à balayage [1], les spores ont été soumises à des techniques rapportées par ailleurs (Roland, 1969; Hideux, 1972).

La recherche et la localisation précise du silicium ont nécessité l'emploi d'un microanalyseur à sonde électronique : le principe de cet appareil et le mode de préparation du matériel (spores entières, fragments de périspore, coupes semi-fines) ont été définis antérieurement (Robert, 1971).

La nature exacte de la silice fut déterminée par absorption des radiations infrarouges; la technique, les résultats et l'interprétation de ces derniers seront exposés dans un paragraphe distinct.

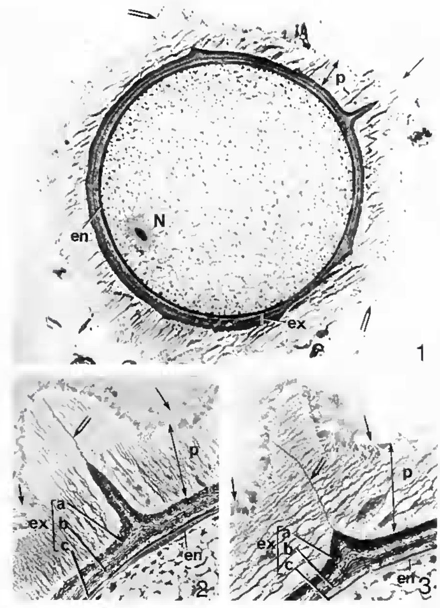
RÉSULTATS

1. ORGANISATION DES MÉGASPORES

Les sporanges des *Isoetes* sont situés chacun à la base d'une feuille, dans une crypte au-dessous de la ligule; ils sont cloisonnés par des trabécules de tissu stérile. Sur chaque pied d'isoète, se développent des sporanges différents : les uns, portés par les feuilles les plus périphériques, sont les premiers formés et contiennent un nombre restreint de mégaspores très volumineuses (600 à 800 µ de diamètre); les autres, localisés sur les feuilles plus axiales, donc plus jeunes, renferment de très nombreuses microspores d'environ 25 à 30 µ de diamètre.

Les mégaspores, auxquelles nous nous sommes intéressées exclusivement, sont de couleur blanche et de forme globuleuse. Elles sont trilètes : leur pôle proximal est marqué par trois bourrelets proéminents (Pl. 1, fig. 1, flèches simples) dont le point de convergence correspond à la partie de la spore qui, immédiatement après la méiose, était orientée vers le centre de

1. Les clichés ont été réalisés à l'aide du microscope à balayage type Stereoscan Cambridge, en service au Laboratoire d'Écologie générale, Muséum national d'Histoire naturelle, Brunoy.



Pl. 2. — Microscopie photonique; Coupes semi-fines, coloration APS : **1**, Mégaspore mûre. Le noyau, *N*, occupe une position excentrée. La paroi est constituée de 3 couches : l'endospore, *en*, l'exospore, *ex*, et la périspore, *p*. Remarquer la section d'une branche de la marque trilète (flèche simple) et les sections du bourrelet subéquatorial (flèches doubles). (× 180). — **2**, Section au niveau d'une branche de la marque trilète : seul le feuillet externe, *a*, de l'exospore participe à sa formation. Les feuillets *b* et *c* sont peu ou pas modifiés. L'endospore, *en*, est épaissie à ce niveau. Une fissure radiale (flèche double) entaille la périspore, *p*. Noter les spicules à la surface de la périspore (flèches simples) (× 550). — **3**, Section au niveau du bourrelet subéquatorial : le pointement du feuillet *a* est peu important. La périspore, *p*, est épaissie. La fissure (flèche double), radiale dans sa partie profonde, s'infléchit brusquement en atteignant l'extérieur (× 550).

la tétrade. La région proximale, plus ou moins aplatie, est séparée de la face distale hémisphérique par un bourrelet sub-équatorial très saillant (Pl. 1, fig. 1, flèches doubles), localisé au tiers supérieur de la spore; il n'est pas rigoureusement annulaire car il s'infléchit vers le pôle proximal à l'extrémité de chacune des trois marques trilètes auxquelles il se raccorde.

La surface de cette mégaspore est ornée, entre les bourrelets trilètes et sub-équatorial, de nombreux mamelons (Pl. 1, fig. 1).

L'examen en microscopie photonique de coupes semi-fines montre que l'organisation interne des mégaspores mûres est relativement simple : elle ne consiste qu'en une cellule (Pl. 2, fig. 1) à cytoplasme surchargé de matériaux de réserves et dont le noyau (*N*, Pl. 2, fig. 1) occupe une position distale. Les organites cytoplasmiques sont concentrés dans la zone périnucléaire. En dehors de cette dernière, le cytoplasme est très pauvre en organites; il se résout à de fins trabécules tissant un réseau irrégulier dans les mailles duquel le matériel de réserve est emprisonné (Pl. 7, fig. 2).

Ces réserves consistent en :

— des *granules polygonaux*, de taille variable, qui s'intègrent parfaitement au réseau cytoplasmique dont ils occupent quelques mailles. Leurs affinités tinctoriales (coloration jaune par l'iode, bleue par le bleu de bromophénol), leurs réponses positives aux méthodes histochimiques de caractérisation des acides aminés (alloxane-schiff) permettent d'affirmer qu'ils sont essentiellement de nature protéique. Lors de la réhydratation des spores (Pl. 7, fig. 2, *gp*), ils perdent leur forme polygonale et se contrastent fortement par le citrate de plomb après fixation osmique.

— des *gouttelettes* (Pl. 7, fig. 2, *gl*), de loin les plus nombreuses, qui occupent la plupart des mailles à l'exclusion de celles occupées par les granules protéiques. Elles sont de nature lipidique comme l'attestent les colorations par le noir et le rouge soudan. Ce sont des huiles liquides à température ordinaire, vraisemblablement des glycérides neutres, car elles se colorent en rose par le bleu de nil, et insaturées comme l'ont montré les résultats de SOSA-BOURDOUIL (1940) sur une espèce voisine.

La recherche des composés polysaccharidiques, notamment de l'amidon qui constitue l'une des formes principales des réserves végétales, s'est toujours révélée négative dans les mégaspores mûres.

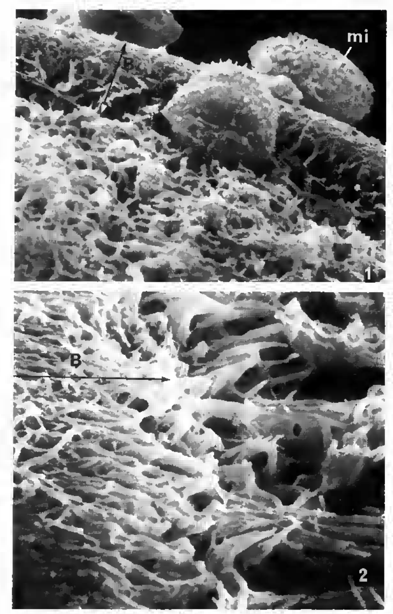
La spore est limitée par une paroi dont l'originalité est due à une forte épaisseur, une organisation relativement simple et une nature complexe. En section et en microscopie photonique, elle révèle trois couches (Pl. 2, fig. 1, 2, 3) qui sont de l'intérieur vers l'extérieur :

— une endospore, *en*, de 0,5 à 1 µ d'épaisseur, cellulosique, au contact du protoplasme;

— une exospore, *ex*, épaisse de 10 à 12 µ, qui se subdivise en trois feuillets bien séparés : l'interne, *c*, fin, continu et étroitement accolé à l'endospore, le médian, *b*, lamellaire et l'externe, *a*, réticulé;

— une périspore épaisse (45 µ), *p*, à contour externe irrégulier et hérissé de multiples spicules (flèches simples, Pl. 2, fig. 2, 3).

Ces trois couches présentent une disposition et une épaisseur constantes sauf au niveau des bourrelets trilètes et sub-équatorial. Les bourrelets tri-



Pl. 3. — Microscopie électronique à balayage : **1**, Profil du bourrelet, B, subéquatorial, *mi*, microspores (× 1 100); **2**, Surface d'un bourrelet, B, trilète (× 2 100).

lètes se forment par la surrection du seul feuillet externe, *a*, de l'exospore (Pl. 2, fig. 2); les feuillets médian, désorganisé à ce niveau, et interne ne participent pas à la genèse de l'ornementation. L'endospore, *en*, est épaissie immédiatement sous le pointement exosporal; la périspore ne subit pas de modification importante.

Le bourrelet sub-équatorial constitue un relief net à la surface de la spore; il est dû également au pointement du seul feuillet externe, *a* (Pl. 2, fig. 3). Là aussi, on observe une désorganisation du feuillet médian, *b*, alors que le feuillet interne, *c*, ne présente pas de transformation notable. Ce bourrelet se distingue des précédents par la surrection moindre de l'exospore et, surtout, par l'important épaississement de la périspore.

Ces deux types de bourrelets s'apparentent par la présence d'une fissure mais se distinguent par l'orientation différente de cette dernière. Rigoureusement radiale et rectiligne dans les bourrelets trilètes, elle traverse presque toute la périspore, ne s'interrompant qu'à quelques microns de la surface (Pl. 2, fig. 2, flèche double). Par contre, dans le bourrelet sub-équatorial, d'abord radial, son tracé s'infléchit brusquement à mi-hauteur de la périspore vers l'un des flancs de l'ornementation (Pl. 2, fig. 3, flèche double). Ces fissures rendent possible, lors de la « germination », la mise à nu de l'exospore au pôle proximal. En cette seule zone, en effet, lors du gonflement dû à la réhydratation, la périspore est éliminée sous forme de trois fragments réguliers, topographiquement délimités par les bourrelets trilètes et sub-équatorial.

2. LOCALISATION DE LA SILICE

La méthode utilisée fut celle de la microanalyse par sonde électronique. Elle présente deux avantages :

— une diagnose sûre des éléments minéraux présents dans les tissus;

— une localisation précise et extrêmement fine dans des volumes réduits de l'ordre du micron-cube.

La présence éventuelle d'éléments minéraux fut recherchée :

1) à la surface de spores entières donc sur la face externe de la périspore. De l'analyse qualitative effectuée, il ressort que seul le silicium est présent à ce niveau; sur la courbe enregistrée, un pic extrêmement net traduit ce fait (fig. 1, A),

2) à partir de fragments de périspore permettant l'analyse des parties internes. Comme précédemment, la réponse n'est positive que pour le seul silicium (fig. 1, B);

3) sur des coupes semi-fines pour déterminer la distribution minérale dans les différentes enveloppes sporales. Aucun élément autre que le silicium n'a été détecté. Pour ce minéral, la réponse est maximale dans la périspore (fig. 1, C), moindre dans l'exospore (fig. 1, D), nulle dans l'endospore. Dans l'exospore, la répartition est hétérogène; seule la zone externe de cette couche en est pourvue.

A la faveur de ces coupes semi-fines, le protoplasme fut prospecté; les éléments minéraux ne s'y rencontrent jamais en densité suffisante pour permettre leur détection.

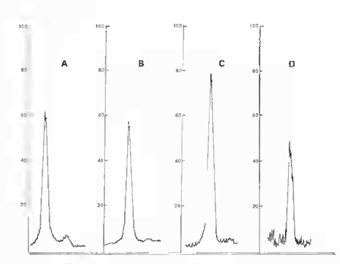


Fig. 1. — Recherche du Silicium à l'aide du microanalyseur à sonde électronique : A, Surface externe de la périspore (sensibilité de l'appareil : 100 de l'échelle correspondent à 3 000 chocs par seconde); B, Face interne de la périspore (sensibilité de l'appareil : 100 de l'échelle correspondent à 3 000 chocs par seconde); C, Coupe semi-fine; faisceau d'électrons concentré sur la seule périspore (sensibilité de l'appareil : 100 de l'échelle correspondent à 1 000 chocs par seconde); D, Coupe semi-fine; faisceau d'électrons concentré sur la zone périphérique de l'exospore (sensibilité de l'appareil : 100 de l'échelle correspondent à 100 chocs par seconde).

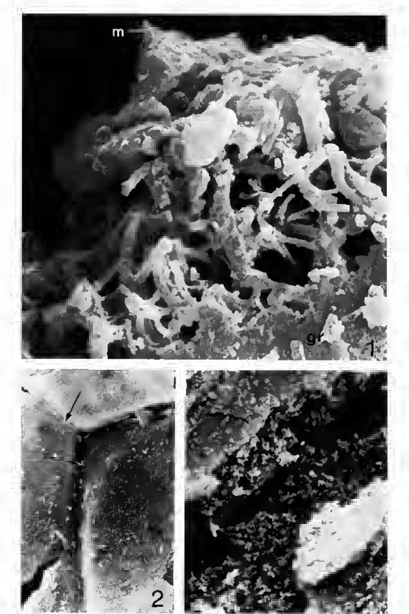
3. ULTRASTRUCTURE DES ENVELOPPES SPORALES

Les examens en microscopie électronique à balayage ont porté sur les faces externe et interne de la périspore d'une part, sur la surface de l'exospore d'autre part.

La face externe de la périspore (Pl. 1, fig. 1) est agrémentée de nombreux mamelons sauf au niveau des bourrelets trilètes et sub-équatorial. Disposés sans ordre préférentiel, ils sont hérissés de spicules plus ou moins longs, enchevêtrés et parfois soudés à ceux des mamelons voisins (Pl. 1, fig. 2). Ces spicules, d'aspect torsadé (Pl. 1, fig. 3), rayonnent à partir du mamelon dont la partie centrale est plus compacte. En section, en microscopie photonique, le mamelon se révèle être un épaississement localisé de la périspore; l'aspect échinulé de cette dernière reste très superficiel (Pl. 2, fig. 3).

Chaque bourrelet comporte (Pl. 3) :

— une zone médiane relativement compacte où les spicules, denses et plus ou moins soudés, présentent une orientation constante, perpendiculaire à l'axe d'allongement du bourrelet;



Pl. 4. — Microscopie électronique à balayage : **1,** Cassure de la périspore entre deux mamelons Raccord entre les spicules superficiels et la zone granuleuse interne, *gr.m,* pointe d'un mamelon (× 5 250); **2,** Vue interne de la périspore au niveau de la fente trilète (flèches) (× 210); **3,** Détail du cliché précédent montrant l'aspect granulaire de la face interne de la périspore (× 5 250).

— deux zones latérales, les flancs, constituées de spicules moins nombreux, donc plus lâches, à orientation moins bien définie; elles assurent la transition entre l'organisation régulière de la zone médiane du bourrelet et celle échinulée du reste de la paroi.

La face interne de la périspore (Pl. 4, fig. 2) apparaît, à faible grossissement, plus homogène que la face externe. A plus forte résolution (Pl. 4, fig. 3), elle montre une texture finement granulaire, composée d'éléments de 0,1 à 0,2 μ. La continuité existant entre la partie profonde granulaire, *gr*, et les spicules de la partie superficielle devient manifeste à la faveur d'une cassure de la périspore (Pl. 4, fig. 1).

Cette couche siliceuse n'est que faiblement liée à l'exospore (Pl. 5, fig. 1), particularité permettant de l'éliminer avec une relative facilité et, partant, d'observer la surface de l'exospore. Cette dernière (Pl. 5, fig. 2) présente, entre les bourrelets, une structure alvéolaire due à l'existence de nombreuses perforations de diamètre variable (de 0,2 à 2 μ). Par contre, au niveau des bourrelets, cette structure disparaît et une autre plus homogène et continue s'y substitue. La surface paraît alors striée dans le sens d'allongement du bourrelet (Pl. 5, fig. 3).

De nombreux granules blanchâtres, correspondant vraisemblablement à de la silice, se rencontrent sur et dans la paroi (Pl. 5, fig. 2, flèches).

Les études en microscopie électronique par transmission ont porté principalement sur des coupes d'exospore. Chez cette dernière, les clichés confirment l'existence des trois feuillets *a*, *b*, *c* (Pl. 6). En dehors des bourrelets, ils sont superposés et d'épaisseur inégale. Le plus profond (*c*, 0,5 à 0,7 μ), étroitement accolé à l'endospore et continu, est formé par une, plus rarement deux, lames (Pl. 7, fig. 2). Il est relié de place en place au feuillet médian. Les deux feuillets, médian (*b*, 4 μ) et externe (*a*, 6 μ), sont constitués de lames plus ou moins longues et anastomosées qui, dans l'espace, édifient un réseau lâche (Pl. 6). Ils diffèrent toutefois par :

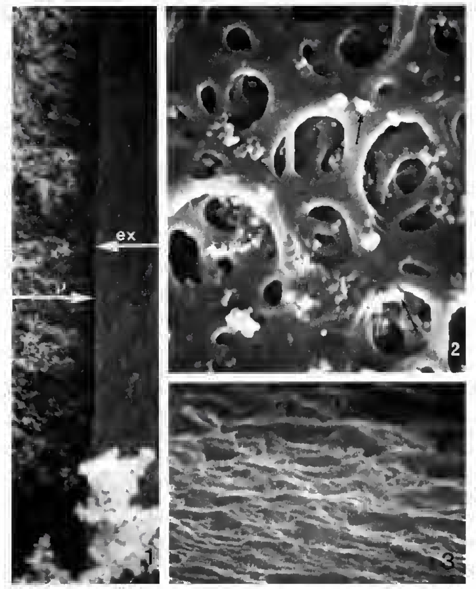
— l'orientation des lames exiniques, plus nettement parallèles et plus proches les unes des autres dans le feuillet médian que dans le feuillet externe;

— des anastomoses plus nombreuses entre les lames au sein du feuillet externe;

— la présence, dans le feuillet externe, de granulations opaques aux électrons (*Si*, Pl. 7, fig. 1) qui s'identifient aux formations minérales de la périspore. Il s'agit donc de granules siliceux. Leur présence explique la réponse positive obtenue à ce niveau lors des analyses par microsonde électronique.

4. NATURE CHIMIQUE DE LA SILICE

La nature chimique de l'incrustation siliceuse fut déterminée par spectrographie d'absorption aux infrarouges. Le principe de cette méthode consiste à soumettre l'échantillon à un faisceau de radiations infrarouges. Le produit étudié absorbe sélectivement certaines d'entre elles; les bandes



Pl. 5. — Microscopie électronique à balayage : **1**, Décollement de la périspore, *p*, mettant à nu l'exospore, *ex* (× 3 000); **2**, Organisation alvéolaire de la zone externe de l'exospore entre les bourrelets. Les granules blanchâtres (flèches) sont des granules de silice (× 11 500); **3**, Surface du pointement exosporal au niveau d'une marque trilète, après élimination de la périspore. On ne retrouve pas l'aspect alvéolaire de l'exospore (× 11 000).

d'absorption alors enregistrées permettent la caractérisation de la forme chimique de l'échantillon.

Les périspores de mégaspores mûres furent prélevées puis, sans aucun traitement préalable, broyées. La poudre résultante fut dispersée dans du bromure de potassium; ce mélange servit à la confection sous pression de micropastilles dont l'analyse fut effectuée avec un spectromètre infrarouge enregistreur Perkin-Elmer.

Enregistrée pour des radiations dont les fréquences s'échelonnent entre 1 400 et 400 cm_{-1}, la courbe d'absorption (Fig. 2) présente :

— deux pics très forts situés respectivement à 1 090 cm_{-1} pour le premier et 465 cm_{-1} pour le second;

— un pic encore nettement dessiné vers 790-800 cm_{-1};

— deux bandes plus ou moins larges, centrées approximativement sur 1 180-1190 cm_{-1} pour l'une et sur 950 cm_{-1} pour l'autre.

La comparaison de cet enregistrement avec les spectres obtenus par Haccuria et reproduits par Lecomte (Fig. 3), relatifs à différentes formes de silice réduite à l'état de poudre, et avec celui établi par Keller et Pickett pour la diatomite, forme d'opale (Fig. 4), conduit aux remarques suivantes.

Toutes les courbes présentent deux pics centrés sur 1 090 et 790-800 cm_{-1}; ces zones d'absorption plus ou moins fortes, dans tous les cas bien dessinées, ne permettent pas d'établir de discrimination entre les formes cristallines et amorphe. Ce fait contredit l'assertion de Yoshida, Ohnishi et Kitagishi selon laquelle « ces deux bandes sont sans aucun doute dues à la liaison Si-O dans la silice amorphe » (1959).

A côté de ces analogies, on relève des différences nettes. L'absence de bandes à 690 et 520 cm_{-1} interdit d'assimiler cette poudre à du quartz; de même, les manques d'absorption à 1 250 et 560 cm_{-1} d'une part, et à 610 cm_{-1} d'autre part, s'opposent à ce qu'il s'agisse de tridymite ou de cristobalite. Par rapport à celui de l'opale pris pour référence, le spectre de la périspore d'*Isoetes* montre, outre les deux pics à 1 090 et 800 cm_{-1}, une bande à 950 cm_{-1}; il ne révèle par contre pas d'absorption pour les radiations de fréquences égales à 1 460, 1 350 et 720 cm_{-1}.

Enfin, le rapprochement de cette courbe avec celle de la silice amorphe (Fig. 3) fait ressortir une concordance totale; nous en avons conclu que la périspore de la mégaspore de l'*Isoetes setacea* est une carapace de silice à l'état de gel.

La documentation relative à la nature de la silice chez les végétaux en exprimant beaucoup, telles les Graminées, est peu abondante. Elle se raréfie encore pour les plantes qui en sont pauvres, telles les Ptéridophytes; la faible importance pondérale du minéral, le plus souvent combiné à des composés organiques, gêne les recherches sur ce sujet. Chez l'isoète, la teneur est très faible par rapport à la plante entière mais forte si on considère la mégaspore chez qui, à maturité, la silice constitue toute la périspore et s'y trouve à l'état à peu près pur. Les deux caractères, localisation topographique précise favorisant l'extraction et pureté du produit sont des atouts précieux pour mener à bien une telle étude.

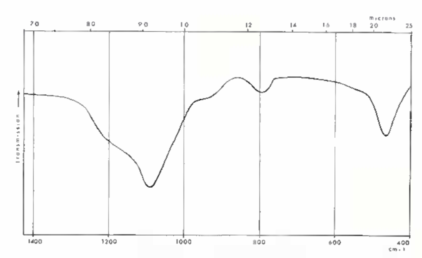


Fig. 2. — Spectre d'absorption des radiations infrarouges par la silice de la paroi périsporale.

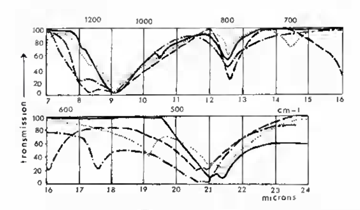


Fig. 3. — Spectres infrarouges de différentes formes de la silice (à l'état de poudre) (d'après M. Haccuria et repris dans Encyclopedia of Physics, 1958).

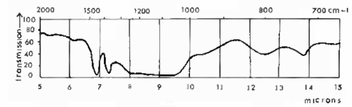


Fig. 4. — Spectre infrarouge de la diatomite (d'après Keller W.D. et Pickett E.E., 1949).

On est frappé par les conclusions divergentes sur la nature de la silice dans un même matériel. Par exemple, chez le riz, la silice serait à l'état d'opale selon LANNING (1963) alors que YOSHIDA, ONISHI et KITAGISHI (1959) précisent qu'elle serait sous forme d'un gel amorphe. Ces derniers auteurs estiment que la distinction entre opale et gel de silice ne peut être faite que grâce à la solubilité plus forte de la seconde forme. Il nous paraît qu'il est possible de trancher par comparaison des courbes d'absorption aux infrarouges. De telles conclusions divergentes ne pourraient-elles pas trouver une explication dans les traitements subis par le matériel préalablement à l'analyse?

LANNING, à qui l'on doit de nombreux travaux sur le sujet, préconise l'incinération à température élevée (700 à 900° C) des échantillons avant de les pulvériser et de les laver par une solution chlorhydrique. Selon nous, un tel traitement est susceptible, dans certains cas, de modifier la nature de la silice. FRONDEL (1962) n'a-t-il pas prouvé qu'à basses températures de l'ordre de 400 °C, en présence d'eau alcaline ou simplement de vapeur d'eau, la silice amorphe pouvait cristalliser en quartz? On sait que la présence de minéralisateurs constitue un facteur essentiel d'accélération de la cristallisation; ainsi, la silice qui est amorphe dans les cendres d'avoine obtenues après calcination entre 450 et 500 °C, se transforme « en un mélange de tridymite et de cristobalite » si la température d'incinération est portée à 1 100 °C (JONES et MILNE, 1963). En l'absence de minéralisateur, une telle transformation nécessite des températures de l'ordre de 1 470 °C pour l'obtention de tridymite et de 1 730 °C pour celle de cristobalite. On voit donc l'importance considérable possible de substances minéralisatrices lors de l'incinération du matériel et les risques éventuels de conclusions erronées. L'existence de quartz signalée par LANNING chez le papyrus, le fraisier, le framboisier, le caféier et d'autres plantes n'est-elle pas directement imputable à la technique de préparation des végétaux?

Toutefois, l'incinération à température voisine de 1 000 °C n'engendre pas systématiquement des modifications; c'est le cas de plantes dont le taux de substances minéralisatrices serait trop faible pour intervenir. LAROCHE (1968) montra que les prêles appartenaient à ce dernier groupe.

Dans nos recherches sur la silice contenue dans la périspore de mégaspore d'isoète, nous n'avons pas eu recours à des traitements thermiques ou chimiques; nos analyses ont révélé que la silice y est à l'état de gel.

DISCUSSION - CONCLUSION

Parmi les Lycopodinées actuelles, seuls les deux genres *Selaginella* et *Isoetes* sont hétérosporés. Leurs mégaspores sont volumineuses et, en leur sein, se différencient des gamétophytes femelles sur lesquels de jeunes sporophytes seront initiés. A maturité, ces spores sont très différentes : à l'état unicellulaire caractérisant l'*Isoetes* s'oppose une organisation pluricellulaire chez le *Selaginella*. Par contre, elles ont en commun une forte accumulation de substances de réserve et une absence totale de chloro-



Pl. 6. — Microscopie électronique par transmission : Coupe de la totalité de l'exospore : *a*, feuillet externe réticulé; *b*, feuillet médian, à structure plus lâche; *c*, feuillet interne formant une couche homogène et continue. La silice, *Si*, se rencontre uniquement dans les mailles du réseau formé par le feuillet externe, *a* (× 15 000).

plastes. Certains auteurs virent dans ces réserves un ensemble de lipides, glucides (grains d'amidon) et protides (CAMPBELL, 1905), alors que d'autres n'y trouvèrent que de l'huile et de l'amidon (LA MOTTE, 1933). Ce sont les analyses chimiques de SOSA-BOURDOUIL (1940), sur *Isoetes Hystrix*, qui permirent de trancher : les réserves ne sont constituées que de lipides et de protides.

Les réserves lipidiques sont, dans les deux genres, des glycérides neutres non saturés (SOSA-BOURDOUIL, 1940; ROBERT, 1971). Par contre, celles de nature protidique diffèrent : par leur morphologie hétérogène et leurs caractères chimiques, elles s'apparentent, chez la sélaginelle à des grains d'aleurone (ROBERT, 1971) tandis que l'homogénéité de leur structure et l'absence de phytine particularisent celles des isoètes (la phytine étant mise en évidence par la métachromasie des colorants bleus d'aniline et par la présence des éléments minéraux Ca, P, Mg).

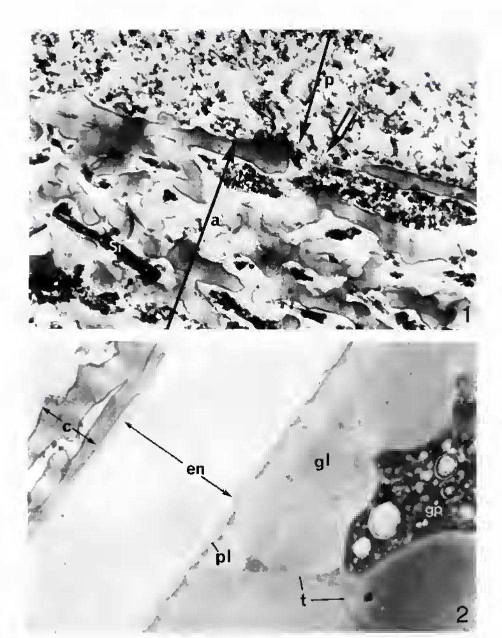
Il est classiquement admis que la paroi mégasporale des *Isoetes* consiste en une endospore, une enveloppe sporopollénique et une périspore.

L'endospore est toujours cellulosique et, contrairement à celle des sélaginelles (KEMPF, 1970; ROBERT, 1971) n'apparaît jamais stratifiée en microscopie électronique.

L'organisation de la paroi sporopollénique chez l'*Isoetes setacea* est lamellaire et les éléments constitutifs tissent un réseau. Cette structure rappelle tout à fait celle décrite par PETTITT (1971) chez l'*Isoetes englemanii*. Il serait toutefois intéressant de savoir si cette organisation se retrouve chez toutes les espèces du genre. De toutes façons, ce type structural, faisant totalement défaut tant chez les Filicinées isosporées (LUGARDON, 1972) que chez les microspores de Lycopodinées, semble constituer un caractère spécifique des seules mégaspores de Lycopodinées. En effet, bien que le réseau y soit quelque peu différent, l'organisation lamellaire décrite chez les sélaginelles (AEZELIUS et Coll., 1954; STAINIER, 1967; SIEVERS et BÜCHEN, 1970) s'identifie à celle des isoètes.

La paroi sporopollénique des mégaspores des isoètes est complexe; les descriptions s'y rapportant laissent apparaître certaines divergences. Alors que TSCHISTIAKOEE (1873) distingue « un exosporium à 5 couches de caractères différents », FITTING (1900) n'y reconnaît qu'une exospore à trois feuillets et une mésospore fine. Chez l'*Isoetes setacea*, nos observations conduisent à n'admettre que trois feuillets. Le plus interne, continu, correspondant vraisemblablement à la mésospore de FITTING, ne peut pas, selon nous, être dissocié de l'exospore en raison de leur identité parfaite de constitution et des liens étroits qui les unissent. De même, chez *Isoetes englemanni*, PETTITT ne fait pas mention d'une mésospore. Comme chez l'*Isoetes setacea*, cet auteur ne distingue qu'une unique couche exosporale. Toutefois, il met l'accent sur les variations rencontrées au sein de la famille (PETTITT, 1966) : par exemple, l'exospore de certaines espèces est épaisse et stratifiée, alors qu'elle est fine et apparemment homogène chez d'autres.

La périspore fut d'abord décrite comme une couche externe calcaire. Avec TSCHISTIAKOFF (1873), « l'épisporium est entièrement incrusté de silice, comme s'il était formé de silice pure; j'ai pu en faire l'analyse quali-



Pl. 7. — Microscopie électronique par transmission : 1, Coupe au niveau de la jonction de la périspore siliceuse, *p*, et du feuillet externe de l'exospore, *a*. Noter (flèche) les discontinuités de la surface exosporale (cf. Pl. 5, 2). Les granules siliceux, *Si*, ont le même contraste que la périspore (× 20 000); 2, L'endospore, *en*, sépare le feuillet interne de l'exospore, *c*, du plasmalemme, *pl*. Au sein du cytoplasme, les granules protéiques, *gp*, et les gouttelettes lipidiques, *gl*, occupent les mailles d'un réseau dessiné par de fins tractus cytoplasmiques, *t* (× 13 500).

tative et je suis persuadé que c'est de la vraie silice » (p. 207). Fitting (1900) confirma sa nature siliceuse. Par des méthodes de microincinération et de dissolution sélective, il montra que l'élément minéral se retrouve aussi dans la partie externe de l'exospore.

Plus tard, les auteurs intéressés par l'organisation de la paroi mégasporale d'*Isoetes*, tels Erdtman, Pettitt, admirent cette nature siliceuse. Toutefois, ils ne mentionnèrent plus la minéralisation du feuillet externe de l'exospore et, partant, laissèrent planer un doute sur son existence. Par la conjonction de méthodes d'observations ultrastructurales et de microanalyses, nous sommes à même d'affirmer que la silice est distribuée entre la périspore qu'elle constitue entièrement, et la zone externe de l'exospore qu'elle imprègne.

Bien que la silice soit présente dans d'autres périspores (*Selaginella galeotti*, Kempf, 1970), elle n'y atteint jamais une importance et un degré de pureté comparables. Les mégaspores d'*Isoetes* revêtent une valeur d'exception chez les Ptéridophytes.

Le dépôt d'une couche minérale aussi épaisse pose un problème de morphogenèse car dans cette périspore, contrairement à ce que suggérait Fitting, les méthodes modernes de détection n'ont jamais permis de déceler un support organique. Son ornementation qui n'intéresse que la partie superficielle, est constante et spécifique, d'où son importance toujours reconnue à des fins systématiques. La régularité parfaite du dépôt minéral, la constance des ornementations auxquelles il donne naissance, nécessitent une activité organisatrice de la matière vivante. Quels mécanismes peuvent y être impliqués?

S'agit-il d'une sorte de jaillissement en des points privilégiés, régulièrement distribués sur l'exospore, mécanisme qui s'apparenterait alors à celui observé sur la tige de l'*Equisetum* (Laroche, 1969)? Selon nous, dans le cas de la mégaspore de l'*Isoetes setacea*, cette hypothèse est en contradiction avec les faits : les observations au microscope électronique à balayage montrent qu'en aucun cas, hormis celui des bourrelets, la périspore ne peut être considérée comme l'image amplifiée de l'exospore. Cette conclusion infirme celle émise par Fitting et Pettitt selon laquelle la configuration de la périspore serait étroitement liée à celle de l'exospore.

Doit-on, avec Tschistiakoff, admettre que la périspore résulterait de la transformation de la paroi spéciale entourant chacune des tétraspores jeunes?

Ou bien, la paroi spéciale joue-t-elle un rôle de moule commandant à l'ornementation? Ce rôle serait alors assimilable à celui de la paroi callosique des microspores de certaines espèces de sélaginelles (Robert, 1971), aux parois polysaccharidiques d'autres Ptéridophytes (Pettitt, 1971) ou même à la primexine des pollens des Phanérogames (Heslop-Harrison, 1963; Echlin et Godwin, 1969).

La réponse à cette question ne peut être donnée au stade de la spore mûre, et seules les recherches en cours, ayant pour thème l'ontogenèse des enveloppes, permettront d'apporter les précisions faisant encore défaut.

BIBLIOGRAPHIE

Afzelius, B. M., Erdtman, G. et Sjöstrand, F. S. — On the fine structure of the spore wall of *Lycopodium clavatum* as revealed by the electron microscope. Svensk Bot. Tidskr. **48** : 155-161 (1954).

Campbell, D. H. — The structure and development of mosses and ferns. New-York (1905).

Echlin, P. and Godwin, H. — The ultrastructure and ontogeny of the pollen in *Helleborus foetidus* L. **III** : The formation of the pollen grain wall. J. Cell Sci. **5** : 459-477 (1969).

Erdtman, G. — Pollen and spore morphology Plant taxonomy. Vol. **II** : Gymnospermae, Pteridophyta, Bryophyta. Uppsala (1957).

Erdtman, G. et Borsa, P. — *Idem*. Vol. IV : Pteridophyta. Uppsala (1971).

Fitting, H. — Bau und Entwicklunggeschichte der Makrosporen von *Isoetes* und *Selaginella* und ihre Bedeutung für die Kenntis des Wachstums pflanzlicher Zellmembranen. Bot. Z. **58** : 107-165 (1900).

Frondel, C. — The system of mineralogy. **III** : Silica minerals. John Wiley and Sons Inc. New-York. 7e éd. (1962).

Heslop-Harrison, J. — Ultrastructural aspects of differentiation in sporogenous tissue. 17th Symp, Soc. Exp. Biol. : 315-340 (1963).

Hideux, M. — Apport du microscope électronique à balayage à l'étude structurale de l'exine et des apertures de quelques Saxifragacées ligneuses. Pollen et Spores. **14** : 25-50 (1972).

Jones, L. H. P. and Milne, A. A. — Studies of silica in the oat plants. **1** : Chemical and physical properties of the silica. Plant and soil Netherl. **18** (2) : 207-220 (1963).

Keller, W. D. and Pickett, E. E. — Absorption of infrared radiations. Amer. mineral. **34** : 855-868 (1949).

Kempf, E. K. — Electrononenmikroskopie der Sporodermis von Megasporen der Gattung *Selaginella* (Pteridophyta). Rev. Palaeobotan. Palynol. **10** : 99-116 (1970).

La Motte, C. — Morphology of the megagametophyte and the embryo sporophyte of *Isoetes lithophila*. Amer. J. Bot. 20 (4) : 217-233 (1933).

Lanning, F. C. — Silicon in rice. J. Agric. food chem. U.S.A. **11** (5) : 435-437 (1963).

Laroche, J. — Contribution à l'étude de l'*Equisetum arvense*. III : Recherches sur la nature et la localisation de la silice chez le sporophyte. Rev. Gén. Bot. **75** : 65-115 (1968).

— État de la silice sur et dans la membrane épidermique des organes aériens stériles d'*Equisetum arvense* L. Rev. Gén. Bot. **76** : 483-489 (1969).

Lecomte, J. — Spectroscopie dans l'infrarouge in Handbuch der Physik. Encyclopedia of Physics. Band XXVI, Vol. XXVI, Springer-Verlag. Berlin (1958).

Lugardon. B, — La structure fine de l'exospore et de la périspore des Filicinées isosporées. **1** : Généralités. Eusporangiées et Osmundales. Pollen et Spores **14** : 227-261 (1972).

Pettitt, J. M. — Exine structure in some fossil and recent spores and pollen as revealed by light and electron microscopy. Bull. Brit. Mus. Hist. Geol. **13** : 223-257 (1966).

— Some ultrastructural aspects of sporoderm formation in Pteridophytes, in Erdtman, G. et Sorsa, P., Pollen and spore morphology **4** : 227-251 (1971).

Pfeiffer, N. E. — Monograph of the Isoetaceae. Ann. Miss. Bot. Gard., **9** (2) : 79-232 (1922).

Robert, D. — Le gaméophytte femelle de *Selaginella kraussiana*. I : Organisation générale de la mégaspore. Le diaphragme et l'endospore. Les réserves. Rev. Cytol. Biol. végé. **34** : 93-164 (1971).

— Étude, en microscopie électronique, des modalités d'édification des parois microsporales chez le *Selaginella selaginoides* L. Mise en place du feuillet externe. C. R. Acad. Sc. Paris **273** : 332-335 (1971).

Roland, F. — Étude de l'ultrastructure des apertures. III : Compléments fournis par le microscope électronique à balayage. Pollen et Spores **11** : 475-498 (1969).

SIEVERS, A. et BUCHEN, B. — Über den Feinbau der wachsenden Megaspore von *Selaginella*. Protoplasma **71** : 267-279 (1970).

SOSA-BOURDOUIL, C. — Sur la signification des différences entre macrospores et microspores de *Selaginella* et d'*Isoetes*. Bull. Soc. Bot. Fr. **87** : 75-79 (1940).

STAINIER, F. — Morphological study of the walls of the mega- and micro-spores of *Selaginella myosurus* (Sw.) Alston. Rev. Palaeobotan. Palynol. **3** : 47-50 (1967).

TSCHISTIAKOFF, J. — Notice préliminaire sur l'histoire du développement des sporanges et des spores de l'*Isoetes durieui*. Bory. N. Giorn. Bot. Ital. **5** : 207-212 (1873).

YOSHIDA, S., OHNISHI, Y. and KITAGISHI, K. — The chemical nature of silicon in rice plant. Soil and plant food. Tokyo **5** : 23-27 (1959).

D.R., F.R.H., J.D., J.L. : Laboratoire de Botanique. Université Paris VI. 12, rue Cuvier 75005 PARIS.
F.R.H. : Laboratoire de Palynologie, E.P.H.E., 61, rue Buffon, 75005 PARIS.
P.F., L.D. : Laboratoire de Cinétique chimique. Université Paris VI, 1, rue Guy-de-La-Brosse 75005 PARIS.